

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos
Naturales



Carrera de Medicina Veterinaria

TEMA: *“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS EN CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.*

**TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

AUTOR

Jorge Fernando Cruz Negrete

DIRECTORA DE TESIS

M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas

LATACUNGA – ECUADOR

2015

AUTORIA

Yo, Jorge Fernando Cruz Negrete, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo a la Universidad Técnica de Cotopaxi, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

.....

Jorge Fernando Cruz Negrete

AUTOR

AVAL DIRECTOR DE TESIS

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Directora de la Tesis con el Tema:

“Evaluación de la Crioconservación de ovocitos en conejos (*oryctolagus cuniculus*) en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi” propuesto por el egresado **Cruz Negrete Jorge Fernando** con CI. 171937514-7. presento el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

.....

M.V.Z. Paola Jael Lascano Armas

Director (a) de Tesis

AVAL MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Miembros de tribunal de la Tesis con el Tema:

“Evaluación de la Crioconservación de ovocitos en conejos (*oryctolagus cuniculus*) en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi” propuesto por el egresado **Cruz Negrete Jorge Fernando**, presentamos el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

Aprobado por:

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina

PRESIDENTE

Dra. Mg. Patricia Marcela Andrade Aulestia

OPOSITOR

Dra. Mg. Jaine Labrada Ching

MIEMBRO

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a Dios, a mis padres, a mi hermano y a todas las personas que me brindaron su apoyo para poder realizarlo, y de una manera muy especial a mis abuelos que siempre estuvieron a mi lado, brindándome todo su amor y apoyo.

Jorge Fernando Cruz Negrete

AGRADECIMIENTO

A mis familiares, quienes me han dado su apoyo.

A mi madre Blanca, quien siempre ha estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional.

A mi hermano Milton, por toda su ayuda.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por abrirme las puertas para alcanzar mi meta.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.

.....

Jorge Fernando Cruz Negrete

PRELIMINARES

Portada

Autoría.....	ii
Aval de la directora.....	iii
Aval de los miembros de tribunal.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Declaración expresa.....	vii
Índice de contenido.....	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de cuadros.....	xiv
Índice de gráficos.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
Índice de fotos.....	xvii
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
Aval de traducción.....	xx
Introducción.....	xxi

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1. Anatomía del aparato reproductivo de la hembra	1
1.1.1. Ovario.....	2
1.1.1.1. Comparación morfológica del ovario en diferentes especie.....	3
1.1.2. Infundíbulo.....	4
1.1.3. Oviductos.....	4
1.1.4. Cuernos uterinos.....	4
1.1.5. Cuello uterino.....	4
1.1.6. Vagina.....	5
1.1.7. Vulva.....	5
1.2. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN EL CONEJO.....	6
1.2.1. El ciclo sexual de la coneja.....	7
1.2.1.1. Teoría de la no existencia de un ciclo sexual.....	8
1.2.1.2. Teoría del ciclo estral.....	9
1.2.2. El Celo.....	9
1.2.2.1. Cambio de conducta.....	9
1.2.2.2. Actitud con el macho.....	10
1.2.2.3. Color de la vulva.....	10
1.2.3. La ovulación.....	10
1.3. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA REPRODUCCIÓN.....	12
1.4. FISIOLÓGÍA OVÁRICA DE LA HEMBRA.....	13
1.4.1. Ovogénesis.....	13
1.4.2. Crecimiento folicular.....	15
1.4.2.1. Folículo primordial.....	15

1.4.2.2.	Folículo primario.....	16
1.4.2.3.	Folículo secundario o preantral.....	16
1.4.2.4.	Folículo terciario o antral.....	17
1.4.2.5.	Folículo preovulatorio o de Graff.....	17
1.4.3.	Maduración del óvulo.....	18
1.5.	OVOCITO.....	18
1.5.1.	Estructura del ovocito.....	19
1.5.1.1.	Zona pelúcida.....	19
1.5.1.2.	Membrana plasmática.....	20
1.5.1.3.	Pronúcleo ovular.....	20
1.5.1.4.	Gránulos corticales.....	20
1.5.1.5.	Espacio perivitelino.....	20
1.5.2.	Clasificación de los ovocitos.....	21
1.6.	ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS.....	21
1.7.	CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS.....	22
1.7.1.	Efectos del enfriamiento y la congelación sobre las estructuras ovocitarias	23
1.7.2.	Crioprotectores y aditivos crioprotectores.....	24
1.7.2.1.	Holding.....	25
1.7.2.2.	Etilenglicol.....	25
1.7.3.	Crioprotectores permeables.....	25
1.7.4.	Crioprotectores no permeables.....	26
1.7.5.	Congelación.....	26
1.7.6.	Descongelación.....	27
1.8	MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS.....	28
1.8.1.	Aspiración de líquido folicular.....	28
1.8.2.	Corte de ovarios.....	28

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Características del lugar.....	29
2.1.1 Situación política.....	29
2.1.2. Situación geográfica.....	29
2.1.3. Datos meteorológicos.....	30
2.2 Materiales.....	30
2.2.1. Materiales de oficina.....	30
2.2.2. Recursos tecnológicos.....	31
2.2.3 Materiales de laboratorio.....	31
2.2.4. Material biológico.....	32
2.2.5. Animales.....	32
2.3. Diseño de la investigación.....	33
2.3.1. Tipo de investigación.....	33
2.3.2. Metodología.....	33
2.3.3. Métodos y técnicas.....	33
2.3.4. Análisis estadístico.....	33
2.4. Desarrollo de la investigación.....	34
2.4.1. Post descongelación.....	35

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
3.1. Número de ovocitos recolectados.....	37
3.2. Estado de madurez.....	39
CONCLUSIONES.....	41

RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Aparato reproductivo de la coneja.....	1
FIGURA 2. Estructura del ovario.....	3
FIGURA 3. Ovulación en la coneja.....	11
FIGURA 4. Diagrama de la oogénesis.....	14
FIGURA 5. Estructuras del ovocito.....	19
FIGURA 6. Tipos de ovocitos por su calidad.....	21
FIGURA 7. Descongelación de pajuelas.....	27

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Morfológica del ovario según la especie.....	3
CUADRO 2. Órganos reproductores de la hembra y sus principales funciones.....	5
CUADRO 3. Porcentaje de saltos fecundos según el color vulvar.....	10
CUADRO 4. Ovocitos recolectados y categorizados en tres tipos.....	37
CUADRO 5. Estados de madurez de los ovocitos.....	39
CUADRO 6. Calidad de ovocitos crioconservados y post descongelados.....	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Calidad de ovocitos.....	38
GRÁFICO 2. Estado de madurez de los ovocitos.....	39
GRÁFICO 3. Calidad de ovocitos crioconservados y post descongelados.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Características de los ovocitos

ANEXO 2. Número de ovocitos obtenidos

ANEXO 3. Ovocitos para crioconservar

ANEXO 4. Número de pajillas crioconservadas

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Extracción de ovarios al momento de faenar.

Foto 2. Ovarios extraídos colocados en cloruro de sodio al 0.9%.

Foto 3. Limpieza de estructuras adyacentes del ovario.

Foto 4. Método de slicing.

Foto 5. Lavado con holding.

Foto 6. Colocación en la caja petri.

Foto 7. Extracción del líquido folicular.

Foto 8. Material extraído se pone en gotas de holding para quitar impurezas.

Foto 9. Se lleva al estereomicroscopio para identificar.

Foto 10. Clasificación por la calidad de ovocitos.

Foto 11. Colocación de la pajilla en la crioconservadora.

Foto 12. Se realiza Seeding.

Foto 13. Se evalúa post descongelación.

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi con el tema evaluación de la crioconservación de ovocitos en conejos, para determinar si son viables antes y después de la crioconservación. Para el estudio se inoculó GnRH sintético a 0,2 ml intramuscular en 10 animales y luego de 2 horas se los faenó para recolectar los 20 ovarios.

Los ovarios obtenidos se colocaron en suero fisiológico para poder transportar al laboratorio, donde se realizó un lavado retirando estructuras anexas y utilizando la técnica de slicing que consiste en hacer cortes finos en los ovarios; se extrajo el líquido folicular en una caja Petri para observar en el estereomicroscopio.

De los 20 ovarios utilizados se pudo obtener 31 ovocitos (100%), categorizados de la siguiente manera: Tipo A: 16 ovocitos (51,61%); Tipo B: 11 ovocitos (35,48%) y Tipo C: 4 ovocitos (12,9%). Según el estado de madurez se determinó que: 16 ovocitos tipo A son inmaduros con un 51,61% y mientras que los 11 ovocitos tipo B y 4 ovocitos tipo C son maduros que representan el 48,38%; donde los de tipo A son crioconservados para luego de 8 días ser descongelados.

La calidad de los 16 ovocitos tipo A crioconservados y posteriormente descongelados se mantuvieron viables por lo que son aptos para la maduración y posterior fecundación in vitro. Se pudo concluir que después del proceso de crioconservación mantienen su calidad, por tanto son viables.

ABSTRACT

This research was conducted at the Reproductive Biotechnology laboratory Veterinary Medicine Career of Cotopaxi Technical University with the theme evaluation of oocytes cryopreservation in rabbits to determine if they are viable before and after cryopreservation. For the study Synthetic GnRH 0.2 ml was inoculated intramuscularly in 10 animals and after 2 hours they were sacrificed to collect the 20 ovaries.

Getting ovaries were placed in to physiological saline to transport or shipping to the laboratory where a washing was performed by withdrawing annexed structures and utilizing the slicing technique which consists on fine ovaries cuts; follicular fluid was extracted in a Petri dish to observe at the stereomicroscope.

Used 20 ovaries could be obtained 31 oocytes (100%), categorized at the following manner: Type A: 16 oocytes (51.61%); Type B: 11 oocytes (35.48%) and Type C: 4 oocytes (12.9%). According to the maturity state it's determined that 16 oocytes type A are immature with 51.61% and while the 11 oocytes type B and 4 oocytes type C are mature that represent 48.38%, where type A are cryopreserved for eight days after thawing.

The quality of 16 oocytes type A cryopreserved and subsequently thawed remained viable so they are apt for maturation and subsequent fertilization in vitro. It could be concluded that after cryopreservation they maintain their quality, so they are viable.

AVAL DE TRADUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En lo que se refiere a conejos, debido a su avance tecnológico en el país tiene interés comercial, existiendo al momento granjas con un número importante de conejos, siendo prioritario como estado trabajar en mejoramiento genético, nutrición, sanidad y manejo, especialmente en las comunidades campesinas, ya que constituyen para éstas su fuente de alimentación y adicionalmente sustento económico para su familia y muy importantes en la producción de carne.

En Ecuador el índice de baja fertilidad de las hembras por la consanguinidad, producto del cruzamiento entre los miembros de la misma camada, siempre es un problema que aqueja a los criadores de los sectores rurales que no tienen los recursos económicos para adquirir razas mejoradas que ayudan al mejoramiento tanto fenotípico como genotípico de sus explotaciones.

La importancia de conservar los recursos zoogenéticos en bancos de ovocitos para transmitir una mejora de la raza haciéndola más adaptable a un medio. Para la conservación de recursos zoogenéticos incluyen la crioconservación de células reproductivas. Los materiales conservados mediante estas técnicas siguen siendo viables y funcionales durante décadas.

Con la conservación de gametos femeninos permitirá que las razas sigan evolucionando en interacción con su entorno. El desarrollo de la crioconservación de ovocitos permitirá disponer de una fuente estable de los mismos para el desarrollo de la fertilización in vitro y otras biotecnologías relacionadas.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la crioconservación de ovocitos en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar un protocolo de crioconservación de ovocitos de conejas sacrificadas.
- Determinar los parámetros de calidad de ovocitos extraídos.
- Establecer el porcentaje de viabilidad de los ovocitos crioconservados.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

- Se logrará evaluar la calidad y viabilidad de los ovocitos crioconservados.

HIPÓTESIS NULA

No se logrará evaluar la calidad y viabilidad de los ovocitos crioconservados.

CAPÍTULO I

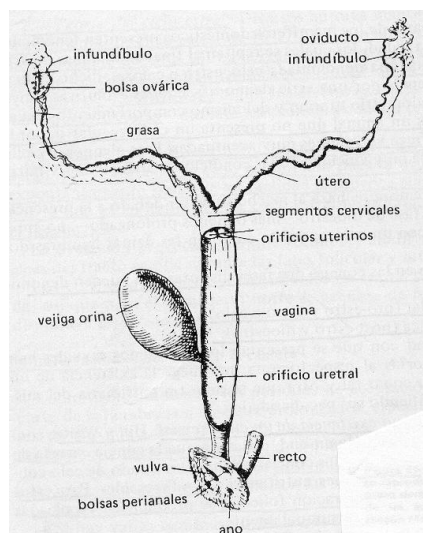
1. REVISIÓN DE LITERATURA

En el presente capítulo se trata las principales características anatómicas y fisiológicas del aparato reproductor de la hembra y el tema relacionado al estudio de los ovocitos extraídos de los ovarios.

1.1. Anatomía del aparato reproductivo de la hembra

Las gónadas de la coneja son los ovarios, y para que se pueda llevar a cabo la reproducción hay otros órganos como son: infundíbulos, oviductos, úteros, vagina y vulva. (3)

FIGURA 1. APARATO REPRODUCTIVO DE LA CONEJA



Fuente: FRANCO, F, GADELLA M., 1998. Manual de crianza de conejos.

La coneja es un mamífero de ciclo reproductivo corto. Sus cuernos uterinos están completamente separados entre sí, desembocando en la vagina de forma independiente a través de canales cervicales, por lo que no se producen migraciones de embriones de un cuerno a otro. (3)

1.1.1. Ovarios

La coneja posee dos ovarios de aspecto arriñonado, alargados y aplastados con una longitud de 1 a 1,5 cm aproximadamente en el eje más largo, de color blanco amarillento, con un peso que oscila entre 200 y 800 mg, frecuentemente rodeados de grasa y envueltos por un pliegue de peritoneo a través del cual se pueden observar unos abultamientos en la superficie que corresponden a los folículos en sus diferentes fases de madurez. En torno a los 80 días y bajo estímulos hormonales comienza la actividad cíclica del ovario, que llevará a la maduración de un determinado número de folículos. Estos folículos secretan estrógenos que actúan sobre el útero preparándolo para recibir un óvulo fecundado y el desarrollo de la gestación. (6)

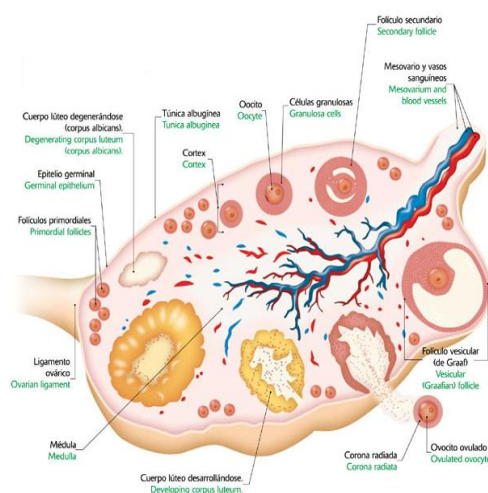
A diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal, realiza tanto funciones exocrinas como endocrinas, son funcionales en las hembras sexualmente maduras. Las células germinales primordiales se originan fuera de la gónada y emigran a través del mesenterio del saco vitelino hacia las crestas genitales.

Presentan dos partes sin separación evidente entre ambas, la externa o corteza y la interna o médula. (8)

La corteza presenta un epitelio de superficie plano o cúbico denominado epitelio germinal. A nivel del hilio ovárico, el epitelio se continúa con el mesotelio del repliegue peritoneal. Debajo del epitelio aparece una capa de tejido conectivo fibroso no modelado denominado túnica albugínea y hacia el interior se dispone un tejido conectivo laxo y aparecen los ovocitos (células primordiales femeninas) y los folículos en diferentes fases de evolución.

La médula está constituida por tejido conectivo laxo con fibras musculares lisas y numerosos vasos sanguíneos (grandes y arrollados), vasos linfáticos y nervios. (9)

FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL OVARIO



Fuente: HAFEZ, *séptima edición*. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales.

1.1.1.1. Comparación morfológica del ovario en diferentes especies

Al nacimiento, una capa de células foliculares rodea los oocitos primarios en el ovario para formar los folículos primordiales. La forma y el tamaño ováricos varían según la especie y la etapa del ciclo estral. (5)

CUADRO 1. MORFOLÓGICA DEL OVARIO SEGÚN LA ESPECIE

	VACA	CERDA	OVEJA	CONEJA	YEGUA
Forma	Almendra	Racimo de uvas	Almendra	Ovoide	Arriñonada
Tamaño	3.5 cm largo y 2.5 cm ancho	5 cm largo y ancho	1.5x1x1	1.5 cm	7-8 cm largo y 3-4 cm ancho

Fuente: HAFEZ, *séptima edición* 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales.

1.1.2. Infundíbulo

Son membranas conjuntivas que poseen prolongadas llamadas fimbrias que realizan la captación o captura del óvulo cuando ha sido expulsado del ovario y están situados junto al ovario (4).

1.1.3. Oviductos

Desembocan en los cuernos uterinos y son cortos, finos, flexuosos y blanquecinos de 1 a 2 cm de longitud aproximadamente, con una forma de embudo en la zona próxima a los ovarios. En los mamíferos domésticos, el ovario se encuentra en una bolsa ovárica abierta, a diferencia de lo que ocurre en otras especies (como rata y ratón), en las que se halla en un saco cerrado.

Dicha bolsa consiste en un delgado pliegue peritoneal del mesosálpinx, que está unido a un asa suspendida en la porción superior del oviducto. Es el lugar donde se realiza la fecundación ovular. (2)

1.1.4. Cuernos uterinos

Aunque parezca que la coneja posee un cuerpo uterino con dos cuernos, la realidad es que el útero es doble, presentando dos cuernos, dos cuerpos y dos cuellos en forma de conos alargados y flexibles no comunicados entre sí, al contrario que en el resto de las especies domésticas, si bien exteriormente tiene un aspecto similar ya que los cuerpos y los cuellos se encuentran unidos.

La longitud de estos cuernos uterinos es de 7 a 8 cm, cada uno provisto de conductos cervicales abiertos directamente en la vagina y es el órgano encargado de alojar los fetos durante la gestación. (11)

1.1.5. Cuello uterino

Es la porción fibromuscular del útero que se proyecta dentro de la vagina y realiza la función de barrera entre el mundo externo, en contacto con la vagina y el ambiente uterino (7).

1.1.6. Vagina

Segmento del aparato genital que acoge el órgano copulador del macho; en ella desemboca la uretra para permitir la salida de la orina procedente de la vejiga urinaria. Tiene unas dimensiones de 1 cm de diámetro y unos 7 cm de longitud aproximadamente (9).

1.1.7. Vulva

Está situada debajo de la cola y mide escasamente 1 cm. La coloración de la vulva tiene cierto interés para averiguar las posibilidades de determinación del celo y la aceptación del macho (4)

Entre las principales funciones que cumplen los órganos reproductores de la hembra tenemos:

CUADRO 2. ÓRGANOS REPRODUCTORES DE LA HEMBRA Y SUS PRINCIPALES FUNCIONES

ÓRGANO	FUNCIONES
Ovarios	Producción de ovocitos.
	Producción de estrógenos (folículos de Degraff).
	Producción de progestágenos (cuerpo lúteo).
Oviductos	Transporte de gametos (espermatozoides y óvulos).
	Sitio de fertilización.
Úteros	Retención y alimentación de embrión y feto.
	Previene la contaminación microbiana del feto.
Cérvix	Reservorio para el semen y transporte de esperma.
	Órgano copulador.
Vagina	Sitio de depósito de semen durante el apareamiento natural.
	Conducto del parto.
Vulva	Abertura externa del aparato reproductor.

Fuente: GARCÍA, PALENCIA 2007. Fisiología del aparato reproductor en animales.

1.2. Fisiología de la reproducción en el conejo

La edad de inicio de la pubertad está mal definida en la coneja, entendiendo por pubertad el momento en que se ovula por primera vez.

Muchos son los factores que influyen en este hecho siendo la raza (la pubertad se inicia antes en las razas de tamaño pequeño o mediano) y el desarrollo corporal (la pubertad se alcanza en la mayoría de las hembras cuando estas alcanzan el 80% de su peso vivo adulto), los más importantes. (17)

La producción de óvulos en las hembras es limitada al contrario de lo que ocurre con los espermatozoides, ya que estos se generan durante toda la vida del macho. La coneja nace con un número de esbozos foliculares que se forman en el período embrionario; a los 13 días de edad de la futura reproductora estos esbozos foliculares dan lugar a los primeros folículos primordiales, que se constituirán en verdaderos folículos alrededor de los 65-70 días (11)

Los primeros apareamientos de la coneja pueden observarse a los dos meses y medio, pero conviene recordar que antes de los 80 días es poco frecuente encontrar óvulos maduros y que el rendimiento de las conejas es mejor si se cubre a partir de las 17 semanas de vida.(13)

Un folículo mide aproximadamente 1,5 mm de diámetro y es una estructura que hace relieve sobre la superficie de ovario, en cuyo seno se encuentra, en período de maduración, un ovocito. Llegado el momento de la ovulación, el folículo se rompe y libera el óvulo que es el gameto femenino.

Los fenómenos de maduración de los folículos primordiales, la ruptura de los folículos y la liberación del óvulo así como los signos externos de celo están gobernados por mecanismos hormonales. (20)

La diferenciación sexual de los gazapos se produce a los 14 - 15 días de vida embrionaria, es decir, hacia la mitad de la gestación. A partir del primitivo epitelio germinativo, tiene lugar tres formaciones sucesivas:

a) Aparición de los cordones ováricos a los 23 días de gestación.

b) Formación del epitelio germinativo primordial al día y medio después del nacimiento; esta segunda proliferación da origen a las células germinativas que madurarán en un futuro.

c) Producción de los primeros ovocitos entre la 3ª y 4ª semana de edad; estas células serán las que darán lugar a los primeros óvulos fecundables. (7)

Para que una coneja se reproduzca, es necesario que haya alcanzado la pubertad y por tanto que tenga una determinada edad, la edad aconsejable para que una coneja entre en reproducción es, cuando ha alcanzado el 80% de su peso adulto (3,0 Kg.) y esto se obtiene a partir de los 4 meses de edad. Hay que distinguir entre pubertad (capacidad para reproducirse) y madurez sexual (máxima potencialidad reproductiva) que se adquiere a partir de los 7 u 8 meses o bien el 2º ó 3º parto. (22)

Por otro lado, la reproducción es una "función de lujo", esto quiere decir que un animal no se va a reproducir o no lo hará con toda su potencialidad si no tiene cubiertas sus necesidades básicas de alimentación, con un aporte energético y vitamínico adecuado; se reproducirá mal si no se encuentra a gusto en su entorno, porque la temperatura no sea la adecuada (muy alta o muy baja), si hay demasiada humedad, si no tiene la luz suficiente, etc; tampoco tendrá una función reproductiva óptima si su estado general no está en buenas condiciones, porque el animal esté parasitado, enfermo, con tiña, sarna, mal de patas, etc. Las situaciones de stress también alteran la reproducción (12).

Para que la reproducción se desarrolle con eficacia y sin contratiempos, es preciso que los animales estén sanos. La presencia de enfermedades o dolencias del tipo que sean, aunque cursen de forma subclínica, interfieren seriamente la procreación (15).

1.2.1. El ciclo sexual de la coneja.

La mayor parte de los mamíferos domésticos presentan fenómenos cíclicos de actividad, los cuales se repiten al final de una fase de actividad sexual máxima

denominada celo, estro o calores. La coneja, es un animal que no presenta un ciclo regular o, por lo menos éste ofrece variaciones muy acentuadas. Para algunos, el ciclismo ovárico está muy vinculado a las condiciones ambientales y nutricionales (18).

Se reconocen en la coneja dos fases distintas que pueden denominarse:

- **Fase folicular**
- **Fase luteínica**

La variabilidad con que se presentan los fenómenos sexuales han sugerido dos teorías al respecto: una que niega la existencia de un ciclismo ovárico como tal y otra que se muestra partidaria del mismo. (22)

1.2.1.1. Teoría de la no existencia de un ciclo sexual

Considerando varias teorías se pensó que la coneja carecía de ciclo estral, afirmando que están en un estado de celo continuo cuando las condiciones nutritivas les son favorables, los ciclos de maduración folicular se producen en oleadas de 7 a 10 días e ininterrumpidamente. (13)

Los folículos tardan 18 días en madurar plenamente y que una vez maduros permanecen vigentes y capaces de ser fecundados durante 7-10 días, pasados los cuales se atrofian; la coneja no presenta una regularidad receptiva, pero sí se dan fechas con mayor porcentaje de aceptación o facilidad para el acoplamiento, comportamiento que oscila según las condiciones de crianza, predisposición genética, ritmo de reproducción, etc. (16)

En condiciones óptimas de crianza, las conejas tienden a presentar celos muy prolongados en el transcurso de los cuales van madurando sucesivamente los folículos, siendo el período de vigencia de los mismos de 12 a 16 días. (24)

La discrepancia principal surge cuando se trata la presencia continua o no de folículos maduros dispuestos para la ovulación, pues a pesar de la vigencia de este

principio no puede omitirse la evidente presencia de períodos de anestro en determinadas épocas del año o bajo ciertas condiciones (8).

Al no ser la ovulación en esta especie una consecuencia directa de la culminación del desarrollo folicular, la coneja presenta ciclo estral, por lo que se requiere de la estimulación coital para desencadenar la descarga ovulante de GnRH. (30)

1.2.1.2. *Teoría del ciclo estral*

Mantiene que la coneja presenta un ciclo estral de 16-17 días, a lo largo de los cuales sería fecundable durante 13 días. El ciclo dura 16 días, de los cuales resultan fecundables del 2o al 14vo.

La duración de la fase de anestro oscila de 46-48 horas, durante la cual las conejas rechazan sistemáticamente el coito.

La teoría del ciclismo en la coneja se considera que se trata de un ciclo incompleto, pues la ovulación no se da espontáneamente, sino que en realidad es inducida por el contacto sexual; por lo que en definitiva, es un ciclo estral monofásico bloqueado en la fase de celo. (13)

1.2.2. *El Celo*

El celo, estro o calores, se define como el período en que la hembra es receptiva al macho y aceptará la cópula. El celo en la coneja, no siempre es tan aparente como en la mayoría de las hembras domésticas, dando lugar a síntomas que pueden presentarse de la siguiente manera (10):

1.2.2.1. *Cambio de conducta*

La coneja se muestra inquieta, agresiva, roe la jaula, frota el mentón contra la malla de la jaula, presenta el dorso ligeramente arqueado o el rabo levantado, y si hay varias hembras juntas se montan entre ellas.

Aunque si bien, estas actitudes se presentan en muchas conejas en celo, no se dan en todas las ocasiones, ni siempre con la misma intensidad (20)

1.2.2.2. *Actitud con el macho*

Situada con el macho, la coneja se aviene enseguida a la cópula. (21)

1.2.2.3. *Color de la vulva*

Se ha podido llegar a una relación entre el color vulvar y los saltos fecundos, comprobándose que la máxima aceptación y resultados se lograban cuando era de color rojo pues se encuentre tumefacta debido a una irrigación sanguínea intensa.

Aunque hay que anotar que muchas veces conejas con vulva de aspecto seco y de color pálido aceptan perfectamente al macho (19).

CUADRO 3. PORCENTAJE DE SALTOS FECUNDOS SEGÚN EL COLOR VULVAR.

COLOR	Blanco	Sonrosado	Rojo	Violáceo
Tasa de aceptación (%)	0	20	80	50

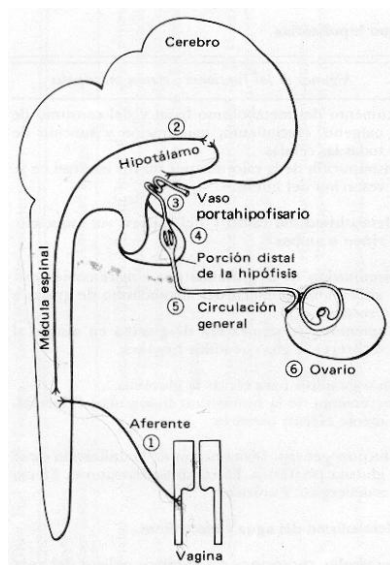
Fuente: VALENCIA M. R., 2004. Reproducción en animales domésticos.

Las manifestaciones externas que indican el celo en la coneja se limitan al aumento de la turgencia y coloración de los labios vulvares (14).

1.2.3. *La ovulación*

Se sabe desde hace tiempo que el coito de la coneja actúa como inductor de la ovulación. Experiencias anatómicas y fisiológicas han demostrado que la ovulación es en la coneja un acontecimiento fisiológico para cuya culminación intervienen los sistemas nervioso y endocrino.

FIGURA 3. OVULACIÓN EN LA CONEJA.



Fuente: BRACKET, 2005. Nuevas técnicas de reproducción en conejos.

Cuando más de una hembra se encuentra en celo, se montan entre ellas produciéndose el conocido fenómeno de la pseudogestación, lo que retrasarían la entrada reproductiva de dichas hembras (16).

La coneja presenta características reproductivas diferentes a otras especies derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular ya que, la ovulación es inducida por el coito más que por el “feedback” positivo de los estrógenos. Éste genera un reflejo neuroendocrino que estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, Gonadotropic Releasing Hormone) por el hipotálamo, con la consiguiente descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH, Luteinizing Hormone) lo que desencadena el proceso de maduración del oocito y la ovulación. (32)

La introducción de la ciclicidad de la producción y la inseminación artificial (IA) en “bandas” o en días fijos de la semana han mejorado de manera significativa el manejo y la productividad en las granjas cunícolas.

Debido a las características particulares de esta especie, es necesario aplicar métodos de inducción de la ovulación, mediante la administración de análogos sintéticos de GnRH por vía intramuscular en el momento de la IA. (5)

1.3. Aspectos fisiológicos de la reproducción

La reproducción en las hembras es un complejo proceso, regulado a tres niveles: cerebro, ovario y útero.

Ahora vamos a suponer que tenemos a una hembra joven que no ha entrado todavía en reproducción y por tanto a nivel del cerebro está en reposo sexual, los ovarios también están en reposo, estando situados a nivel de la 4ª vértebra lumbar, presentando el tamaño de una almendra pelada (3).

En el interior de este ovario se encuentran los ovocitos o gametos femeninos en un número constante en cada hembra, cada uno de estos gametos está dentro de una especie de cápsula en el ovario que se denomina folículo.

Cuando introducimos a esta hembra en la nave de maternidad, esta se estimula por la observación de sus vecinas y por el olor de los machos. En el cerebro de esta coneja se produce una hormona llamada FSH que va a actuar sobre los ovarios que estaban en reposo, haciendo que un determinado número de folículos aumente de tamaño y se vayan aproximando a la superficie del órgano (11).

Cuando estos folículos alcanzan su máximo volumen hacen relieve sobre la superficie del ovario. El líquido que hay en el interior de estos folículos. Entre la ovulación y el parto existe una fuerte pérdida de embriones; la mortalidad embrionaria se considera está comprendida entre el 20 y el 30 % de los óvulos fecundados (8).

Este fenómeno se acentúa a partir del cuarto parto. Produce unas sustancias que son los estrógenos, también denominados hormonas femeninas que informan a la hembra que ya está preparada para la maternidad, haciendo que se presenten las

manifestaciones del celo en la coneja, que la vulva adquiriera coloración roja y que la hembra acepte al macho (18).

En el momento de la cubrición, se producen estímulos emocionales generales y estímulos locales a través de receptores localizados en el área genital (flor radiada de los Cervix) que llegan al cerebro, el cual produce otra hormona llamada LH que hace que se dejen de producir estrógenos y desaparezcan las manifestaciones de celo y que el folículo prominente se rompa y el gameto salga al exterior del ovario, a este fenómeno se le conoce como ovulación provocada o inducida, sin el coito u otro motivo de ovulación .

La actividad ovárica se reduce a períodos de crecimiento y regresión folicular donde los folículos degeneran y desaparecen en el interior del ovario sin llegar a eclosionar (20).

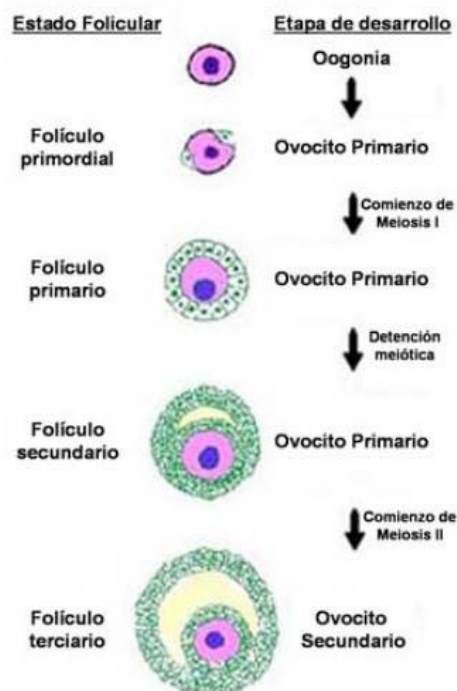
1.4. Fisiología ovárica de la hembra

1.4.1. Ovogénesis

Es la gametogénesis femenina, es decir, el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como productos una célula haploide funcional (el óvulo) y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares) (9).

Las células del organismo poseen una dotación genética compuesta por 46 cromosomas. Las células germinales poseen sólo 23. Al unirse tras la fecundación un ovocito con 23 cromosomas y un espermatozoide con 23 cromosomas darán lugar a un embrión con células de 46 cromosomas (14).

FIGURA 4. DIAGRAMA DE LA OOGÉNESIS.



Fuente: HERNANDEZ, A, 2006. Fisiología de los animales.

En la mayoría de los mamíferos, la oogénesis comienza durante la vida embrionaria y la transformación de las oogonias (células diploides) en ovocitos (células haploides) se completa antes del nacimiento. En la coneja, la oogénesis se inicia al nacimiento y las oogonias comienzan la meiosis y se transforman en ovocitos durante los primeros 10 días de vida (22).

En la tercera semana de edad, el ovario ya presenta folículos primordiales y folículos en desarrollo, mientras que los primeros folículos antrales se detectan a partir de la 12ª semana de vida (25).

De esta forma, en las primeras semanas después del nacimiento, la coneja ya contará con la dotación de ovocitos disponibles para el resto de su vida reproductiva. A partir de aquí, se producen oleadas de crecimiento folicular (foliculogénesis) y regresión (atresia) de manera constante, aunque el núcleo del ovocito permanecerá detenido en el estadio de diploide de la profase de la primera división meiótica, estadio nuclear que mantendrá hasta pocas horas antes de la ovulación. (29)

1.4.2. Crecimiento folicular

Representa una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraovaricos e intrafoliculares, y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos (14).

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación (inducidas por hormonas) de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas (17).

La producción de estradiol determina cuál folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotropínicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia. (24)

Sin embargo, a lo largo de la foliculogénesis, la maquinaria molecular del ovocito está activa. El nucleolo presenta una estructura fibrogranular que refleja la actividad sintética del ovocito durante su crecimiento. En este periodo, sintetiza y almacena grandes cantidades de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas que es a lo que se debe su aumento de tamaño (26).

Durante la foliculogénesis se pueden definir folículos en cinco estadios morfológicos, que a su vez, se pueden agrupar en relación al momento en el que se forma el antro folicular en: folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios) (7):

1.4.2.1. Folículo primordial.

Es la primera fase de evolución folicular del ovocito, está constituido por un ovocito rodeado de un epitelio simple plano, que descansa sobre una membrana basal, tiene un núcleo excéntrico grande y vesiculoso, con un nucléolo muy desarrollado. El ovocito se encuentra rodeado de una capa de células planas

conectadas entre sí y al ovocito mediante las uniones “gap”, las cuales permiten el intercambio de pequeñas moléculas, señales y nutrientes. El diámetro del folículo y del ovocito en este estadio en la coneja está en torno a 30-44 μm . (24)

1.4.2.2. Folículo primario.

Se caracteriza porque se produce un aumento de tamaño en el ovocito y las células foliculares pasan de ser planas a cúbicas. El folículo tiene un diámetro de unos 100-120 μm . Las células foliculares planas que rodean al ovocito en crecimiento se transforman en una capa de células cúbicas. La membrana basal que rodea al folículo aumenta de grosor y se denomina lámina limitante externa. Las células del estroma circundante del folículo se van diferenciando y concentrando alrededor de la limitante externa constituyendo la teca. En el límite entre el ovocito y las células de la granulosa se forma un espacio denominado zona pelúcida, que esta relleno por una sustancia glicoproteica PAS, secretada por las células de la granulosa y posteriormente, también por el ovocito (18).

Hacia esta zona se proyectan las microvellosidades del oocito y las de las celualas de la granulosa para favorecer el intercambio de elementos. El ovocito de la coneja experimenta un gran crecimiento llegando a medir alrededor de 60 μm (16).

1.4.2.3. Folículo secundario o preantral.

Se caracteriza porque se produce un aumento de las células de la granulosa, que inician la secreción de líquido folicular que forma cavidades y espacios intercelulares. Los espacios intercelulares van aumentando de tamaño y numero y confluyendo, dando lugar a una cavidad principal denominada antro folicular, por lo que a este folículo también se le denomina antral (30).

En esta fase el ovocito alcanza su tamaño máximo. El folículo mide unos 200 μm de diámetro medio. Consta de un ovocito que alcanza casi su tamaño máximo (80-

104 μm), con dos o más capas de células de la granulosa alrededor que se multiplican rápidamente; comienzan a desarrollarse las células de la teca y su vascularización. (6)

1.4.2.4. Folículo terciario o antral.

Estos folículos en la coneja tienen un diámetro superior a 200-250 μm según distintos autores. Aparecen espacios ocupados por líquido folicular, producidos por el metabolismo de las células foliculares, los cuales van formando una cavidad llamada antro folicular. El ovocito crece hasta unos 133-135 μm y presenta de seis a nueve capas de células de la granulosa. (15)

1.4.2.5. Folículo preovulatorio o de Graff.

Es el folículo preparado para la ovulación, por ello se le denomina folículo maduro. Conforme el antro va creciendo, el ovocito se ve desplazado excéntricamente y se sitúa en una acumulación de células de la granulosa denominada cumulus ooforus. Las células de la granulosa que se disponen alrededor del ovocito constituyen la corona radiada. En la coneja, estos folículos tienen un diámetro superior a 800-900 μm y el ovocito mide entre 140-143 μm (19).

El antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias desconocidas (26).

Las células de la teca interna y externa están completamente formadas. Durante este periodo, el ovocito apenas aumenta su tamaño produciéndose el crecimiento de los folículos antrales principalmente por el acúmulo de líquido folicular. (28)

1.4.3. Maduración del óvulo.

Antes de que se produzca la ovulación y la posterior fecundación, si se produce, debe terminar la meiosis. Esta comienza en las fases tempranas del desarrollo fetal. Los oocitos primarios provenientes de la división de las células germinales primordiales entran en profase de la primera división meiótica y se detienen en el diploteno, reanudándose en los oocitos de los folículos maduros, dando lugar a los oocitos secundarios. La división se para de nuevo en la metafase de la segunda división meiótica, terminándose rápidamente en el caso de que haya fecundación (22).

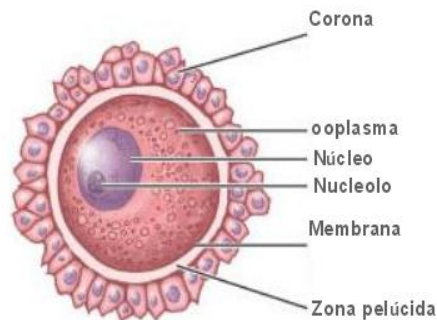
1.5. OVOCITO

En organismos animales, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian y originan ovocitos (u oocitos) y espermatozoides. Los ovocitos presentan un tamaño medio de 75 μm de diámetro en el ratón y de 100 μm en el ovocito humano. Los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo oóforo (15).

El grado de crecimiento ovocitario se relaciona directamente con el número de células de la granulosa que lo rodean. También se ha propuesto que las células del cúmulo, después de la maduración del ovocito, pueden ayudar a guiar al espermatozoide hacia el ovocito justo antes de la fecundación, aunque no ha llegado a demostrarse este extremo.

La ruptura de las células del cúmulo se lleva a cabo por diferentes enzimas liberadas por los espermatozoides (31).

FIGURA 5. ESTRUCTURAS DEL OVOCITO



Fuente: PALMA, G. 2003. Biotecnología de la reproducción.

En cuanto a la estructura celular del ovocito en su etapa más temprana de crecimiento, la mayoría de los orgánulos subcelulares se encuentran agrupados alrededor del núcleo en el ooplasma o citoplasma del ovocito formando lo que se conoce como corpúsculo de Balbiani o núcleo de yolk. A partir de este estadio inicial los orgánulos presentan un periodo de intensa actividad de síntesis de RNA que va cesando gradualmente a lo largo del crecimiento, pudiendo aumentar de volumen 150 veces en el ratón desde el ovocito primordial al estado (4).

El nucleolo pasa de un estado difuso y de aspecto reticular a un estado más denso y uniforme. Con el crecimiento del ovocito aumenta el número de ribosomas y de mitocondrias (5).

1.5.1. Estructura del ovocito

1.5.1.1. Zona pelúcida

Se denomina zona pelúcida (ZP) a la capa externa que rodea el ovocito de los mamíferos en el folículo de Graaf, separándolo del espacio perivitelineo.

Está compuesta por varias glicoproteínas agrupadas en tres familias: ZP1, ZP2 y ZP3, según sus propiedades inmunológicas y funcionales, y tiene un espesor total de 0.015-0.020 mm. (13)

1.5.1.2. *Membrana plasmática*

La membrana plasmática o celular es una estructura laminar que engloba a las células, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de éstas.

Además, se asemeja a las membranas que delimitan los orgánulos de células eucariotas. (15)

1.5.1.3. *Pronúcleo ovular*

El pronúcleo es el núcleo de los gametos. Posee la mitad del número de cromosomas de los núcleos de las otras células no reproductivas.

Durante la fecundación los pronúcleos de un óvulo y al menos un espermatozoide se fusiona para crear el núcleo único del cigoto. (24)

1.5.1.4. *Gránulos corticales*

Gránulo vesicular, de un diámetro de 0,3 a 0,5 micras, que se encuentra bordeando toda la superficie interna del ovocito y que, tras la fecundación, se fusiona con la membrana plasmática, liberando un contenido que da lugar a lo que se llama reacción cortical, para formar la membrana de fecundación, evitando así la entrada de nuevos espermatozoides y, por tanto, la polispermia (17).

1.5.1.5. *Espacio perivitelino*

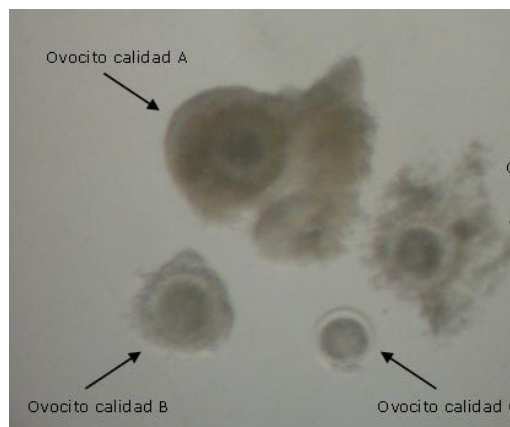
Espacio que queda entre el ovocito y la zona pelúcida que lo envuelve, de un grosor aproximado de entre 0,2 y 0,4 micras. (8)

1.5.2. Clasificación de los ovocitos

Se los puede clasificar en cuatro tipos:

- Tipo A: ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente.
- Tipo B: capas múltiples de cumulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras.
- Tipo C: cumulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras (25).

FIGURA 6. TIPOS DE OVOCITOS POR SU CALIDAD



Fuente: LAING J.A.; W.J. Brinley Morgan; W.C. Wagner; 2006. Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria.

1.6. ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS

Estructuralmente el ovocito maduro mide entre 110-115 micras y está rodeado de una membrana llamada oolema. Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-oolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 micras que disminuye tras de la fecundación (32).

El conjunto ovocito–zona pelúcida mide aproximadamente 150 micras. Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el corpúsculo polar. (14)

La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. Se cree que hace falta un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del primer CP, para que el citoplasma madure completamente. Un ovocito puede ser meioticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que puede llevar a fallos o defectos en la fecundación. (20)

Los ovocitos recuperados tras la punción folicular están rodeados de células de la granulosa que forman el *cumulus ooforus*. Estas células son imprescindibles para la reanudación de la meiosis. La capa mas interna constituye la corona radiata.

Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cumulo y la corona que lo rodea:

- Metafase II: células del cumulo expandidas y luteinizadas.
- Metafase I: células del cumulo menos expandidas.
- Profase I: células del cumulo compactadas. (32)

1.7. CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS

Es una técnica destinada a conservar gametos femeninos con fines reproductivos, para lo cual deben ser extraídos del ovario y criopreservados, esto se lleva a cabo mediante exposición a temperaturas bajas tanto por razones biológicas como por razones comerciales. Al conservar células a temperaturas extremadamente bajas es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, etc., es decir, es posible mantener células durante un largo período de tiempo sin afectar a su viabilidad ni causar cambios genéticos. No obstante, la mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido

expuestas a una solución que las proteja y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (22)

El ovocito es un tipo celular único que posee un gran tamaño y una baja relación superficie-volumen. Además, está rodeado por la zona pelúcida (ZP) y por varias capas de células del cúmulus oophorus. La presencia de estas capas celulares que rodean al ovocito y que juegan un papel importante durante la etapa de crecimiento del ovocito mediante una cooperación metabólica, hacen de este tipo celular una estructura muy difícil de crioconservar (12).

Hasta la actualidad se han podido crioconservar ovocitos de varias especies animales utilizando diferentes técnicas y crioprotectores: en el conejo, por congelación lenta y rápida; en la rata, por congelación lenta y ultrarrápida; en el ratón, por congelación lenta, ultrarrápida y vitrificación; en la vaca, por congelación lenta, ultrarrápida y vitrificación; en la yegua, por congelación lenta y por vitrificación; en la cerda, por congelación ultrarrápida y por vitrificación y en la mujer, por congelación lenta y por vitrificación (33).

Desafortunadamente, los protocolos desarrollados para una especie en concreto son usualmente muy difíciles de adaptar a otra especie debido a diferencias en el tamaño del ovocito y a su sensibilidad al enfriamiento y a los crioprotectores. El factor más crítico para la crioconservación de ovocitos es su compleja organización subcelular. Los efectos del enfriamiento afectan a los elementos del citoesqueleto como son la placa metafásica o la integridad de los microtúbulos y también puede afectar a los gránulos corticales produciendo el endurecimiento de la zona pelúcida (17).

1.7.1. Efectos del enfriamiento y la congelación sobre las estructuras ovocitarias.

La mayoría de los estudios sobre la hipotermia en ovocitos mamíferos se limitan principalmente a los efectos de esta sobre la morfología, la citología y la

competencia para el desarrollo embrionario de los ovocitos enfriados o crioconservados. Cuando se somete a un ovocito a temperaturas inferiores a las fisiológicas y estas se elevan nuevamente a 37 °C, el ovocito sufre una serie de cambios físicos y fisiológicos (20).

No obstante, los mayores daños se producen entre +15 y -5 °C. Temperaturas entre +30 y 0 °C pueden comprometer la integridad de la membrana, el metabolismo celular, el citoesqueleto y la capacidad celular de controlar y reparar los daños producidos por los radicales libres. Por otro lado, las temperaturas por debajo de 0 °C suponen un alto riesgo de formación de hielo intracelular el cual puede provocar un daño irreparable en la célula (16).

1.7.2. Crioprotectores y aditivos crioprotectores.

Los crioprotectores o CPA (Cryoprotector Agent) se clasifican, desde el punto de vista farmacológico, como drogas de acción inespecífica que permiten a las células sobrevivir a la congelación del agua a través de diferentes mecanismos, es decir, no consiguen su efecto actuando directamente sobre receptores, enzimas o genes específicos (19).

Entre los diferentes CPA, citar los alcoholes (incluyendo los glicoles), las aminas (incluyendo las amidas), los azúcares, las sales inorgánicas y las macromoléculas (incluyendo proteínas y polisacáridos) (33).

A pesar de su variada naturaleza química, todos los CPA son solubles en medios acuosos y tienen capacidad de formar puentes de hidrógeno. Las drogas no específicas, al igual que las específicas, también presentan efectos adversos sumados a los efectos deseados (29).

Los crioprotectores tratan de evitar los daños causados por la congelación.

Para conseguir este objetivo, actúan básicamente sobre dos aspectos de la congelación:

1. Sobre la formación de cristales de hielo, puesto que inicialmente disminuyen la temperatura a la cual se forman los núcleos de hielo (de 0 °C a -4/-5 °C), es decir, favorecen la formación de agua “superfría” sin que se inicie la formación de cristales de hielo (31).

2. Sobre la deshidratación de la célula, debido a su elevada osmolaridad. Esta deshidratación también previene la formación de cristales de hielo intracelulares (34).

1.7.2.1. *Holding*

Es el primer medio de mantenimiento para transferencia de embriones de vacuno cuya fórmula ha sido adaptada de un medio para cultivo de embriones. Holding Plus se ha diseñado para optimizar la supervivencia del embrión a temperatura ambiente y proporciona los aminoácidos esenciales, los factores de crecimiento, las enzimas, los substratos de energía y los antibióticos necesarios (19).

Holding Plus no es un medio apropiado para el cultivo de los embriones de vacuno durante periodos largos y en incubadora de CO₂ (24).

1.7.2.2. *Etilenglicol*

Previene el daño celular durante la congelación y descongelación reemplazando el agua intracelular minimizando la formación de cristales, y así regulando la deshidratación y protegen la estructura proteica (31).

1.7.3. *Crioprotectores permeables*

Los crioprotectores pueden ser clasificados en permeables o impermeables, según tengan o no capacidad para atravesar la membrana plasmática. Los crioprotectores permeables, debido a que tienen un peso molecular bajo, son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva. Entre estos, se encuentran los

alcoholes como el glicerol, el etilenglicol, el propilenglicol o el sorbitol y las aminos como la acetamida, la betaína, la formamida, la glutamina, la lisina o la taurina (30).

De todos, el etilenglicol es el CPA permeable más ampliamente usado para la vitrificación de embriones y ovocitos debido a su baja toxicidad celular y a su rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática (8).

1.7.4. Crioprotectores no permeables

Los crioprotectores no permeables no son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su elevado peso molecular y a su compleja estructura. Además, no presentan efecto crioprotector por si solos (3).

Su principal función crioprotectora es la de elevar la presión osmótica, disminuyendo, de esta forma, la cantidad requerida de crioprotector permeable y su toxicidad, y favoreciendo así la deshidratación de la célula. Dentro de este grupo se encuentran los azúcares tales como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la trealosa y la lactosa (16).

Estas macromoléculas son capaces de extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica pero sin penetrar en la célula. Diferentes estudios han evidenciado que estas moléculas son capaces de encapsular al ovocito o embrión en una matriz viscosa previniendo la cristalización intracelular durante la descongelación y actuando como tampón osmótico al reducir el choque osmótico que podría resultar de la dilución del crioprotector (6).

También se ha observado que la adición de azúcares a los medios de crioconservación favorece la estabilidad de la membrana plasmática durante los procesos desvitrificación y descongelación (18).

1.7.5. Congelación

Los ovocitos alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura lo mantienen durante el enfriamiento. Se lleva a cabo lentamente

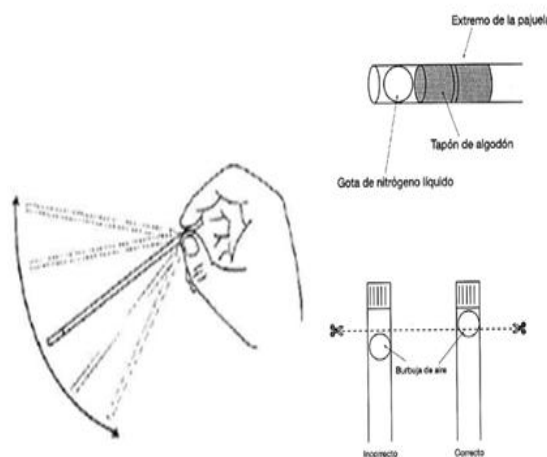
permitiéndole a los ovocitos contraerse y ceder agua en respuesta al incremento gradual de la concentración de la solución extracelular. Se expone el ovocito al crioprotector entre 10 a 30 minutos lo cual lo deshidrata reduciendo el riesgo de formación de cristales de hielo (27).

Entre los rangos de congelación esta de 0.3-0.5°C/min desde la formación de hielo que se da entre -5 y -9°C hasta llegar a -33 y -40°C. Luego se pasa al nitrógeno líquido y para evitar la formación de cristales de hielo se hace seeding (consiste en que una vez estabilizada la pajilla a -5 y -9°C se toca su pared con un objeto frío a -196°C lo cual hace que se cristalice el líquido extracelular) (28).

1.7.6. Descongelación

Se mantiene en el aire y se sacude en un solo movimiento desprendiendo gotas de nitrógeno líquido que hayan quedado en el tapón de algodón y luego se coloca a baño maría para descongelar. Posteriormente se seca y se da una última sacudida tomándola desde el extremo que se va a cortar haciendo que la burbuja de aire se desplace (30).

FIGURA 7. DESCONGELACIÓN DE PAJUELAS



Fuente: ROA N. A., LINARES T., TAMASAUkas R. 2003. Consejos prácticos, Producción animal.

1.8. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS.

Se maximiza el número de ovocitos de buena calidad recuperados de ovarios y que pueden ser usados para la maduración, fecundación y cultivo in vitro.

Se extrae de los ovarios de animales faenados los mismos que proporcionan abundantes ovocitos de diferentes etapas reproductivas (25).

1.8.1. Aspiración de líquido folicular

Se absorbe con la ayuda de agujas hipodérmicas, luego ser colocadas en cajas Petri para su posterior observación en el microscopio determinando la calidad de la muestra (33).

1.8.2. Corte de ovarios

Consiste en hacer cortes finos en los ovarios con la ayuda de un bisturí de afuera hacia dentro colocando el material folicular en solución salina con una temperatura óptima y depositándola en una caja Petri lista para su traslado (32).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe las características, la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio los materiales y equipos utilizados para su desarrollo, los métodos y técnicas aplicadas.

2.1. CARACTERISTICAS DEL LUGAR

2.1.1. Situación política

Provincia: Cotopaxi.

Cantón: Latacunga.

Parroquia: Eloy Alfaro.

Barrio: Salache Bajo.

2.1.2. Situación geográfica.

Latitud: 00° 59'47.68"S.

Longitud: 78° 31'9.16"W.

Altitud: 2757.591 m.s.n.m.

2.1.3. Datos meteorológicos.

Temperatura promedio: 10.7°C

Pluviosidad: 175 mm (anuales)

Horas luz/día: 12 horas.

Viento: Sureste-Noreste.

Nubosidad anual: 4.7/8.

Fuente: Registros administración CEYPSA/2007

2.2. MATERIALES.

Los materiales que se utilizaron fueron:

2.2.1. Materiales de oficina

- Libreta.
- Resma de hojas
- Esferográficos
- Anillados.
- Cd.
- Papel bond.
- Copias.

- Impresiones.
- Empastados.

2.2.2. Recursos tecnológicos

- Calculadora.
- Cámara fotográfica.
- Flash memory.
- Internet.

2.2.3. Materiales de laboratorio

- Mandil.
- Guantes.
- Cofia.
- Mascarilla.
- Ropa quirúrgica.
- Jeringuillas.
- Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745).
- Micropipetas.
- Cloruro de sodio al 0.9%.

- Cajas Petri.
- Bisturí.
- Bolas de sellado de pajuelas.
- Goteros.
- Solución etilenglicol (minitub).
- Solución Holding (minitub).
- Tubos de ensayo (BD Vacutainer).
- Gradillas.
- Pajillas de 0.25
- Crioconservadora (Cryologic Freeze Control)
- Termo de nitrógeno líquido (SEMEX).
- Tapones de pajuelas de embriones.
- Centrífuga (Centrifuge PLC series)

2.2.4. Material biológico

- Ovocitos

2.2.5. Animales

- 10 conejas de las cuales se obtuvieron los ovarios.

2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.3.1. *Tipo de investigación*

Descriptiva: describe las características y los datos de la población o fenómeno en estudio; en este caso la crioconservación de los ovocitos extraídos de los ovarios de las conejas.

2.3.2. *Metodología*

No experimental: que está basada en la no manipulación de una variable no comprobada con el fin de describir la causa por la que se produce la situación o acontecimiento y el investigador tiene que limitarse a la observación de situaciones ya existentes dada la incapacidad de influir sobre las variables y sus efectos lo que dentro de este ensayo dará información sobre la crioconservación de ovocitos para futuras investigaciones.

2.3.3. *Métodos y técnicas*

Analítico-sintético: por medio del cual se llega a la verdad de las cosas, primero se separan los elementos que intervienen en la realización de un fenómeno determinado, después se reúnen los elementos que tienen relación lógica entre sí (como en un rompecabezas) hasta completar y demostrar la verdad del conocimiento, determinando así lo factible de la investigación donde los datos serán posteriormente analizados y puestos en conocimiento a quienes sea de interés, y de esa manera poder obtener conclusiones y recomendaciones.

2.3.4. *Análisis estadístico*

Es el análisis que emplea técnicas estadísticas para interpretar datos, ya sea para ayudar en la toma de decisiones o para explicar los condicionantes que determinan la ocurrencia de algún fenómeno, en esta investigación los resultados se los representó utilizando gráficos, tablas y porcentajes ya que en este ensayo no se realizó ningún tipo de comparación como para que se aplique diseño experimental.

2.4. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

Para la realización de esta investigación se inoculó a los conejos previamente a su faenamiento GnRH intramuscular con dosis de 0.2 ml, ya que es necesario realizar una estimulación por lo que se realizó 5 prácticas, cada práctica con 4 ovarios procedentes de 2 conejas de segundo parto con el siguiente protocolo que se describe a continuación:

- Selección de los animales en el camal.
- Inoculación de GnRh sintética (0.2 ml) intramuscular.
- Sacrificio de los animales 2 horas después de la inoculación.
- Recolección de ovarios de los animales faenados.
- Una vez extraídos se colocan en un termo con cloruro de sodio al 0.9% con la finalidad de mantener intactas las estructuras.
- El tiempo de llegada al laboratorio con el material biológico es en el transcurso de 2 horas.
- Al llegar al laboratorio se procedió a retirar las estructuras anexas de los ovarios que aún quedaban impregnadas como ligamentos, tejido adiposo, fascias.
- Luego se realizó un lavado adicional de los ovarios con el objetivo de quitar las impurezas restantes.
- Se procede a realizar un corte transversal en el ovario con la ayuda de un bisturí número 15.
- Se hacen lavados retrógrados del ovario seccionado con solución holding y el contenido con el líquido folicular se deposita en una caja Petri para luego llevado al estereomicroscopio para realizar la selección de los ovocitos garantizando un óptimo resultado categorizándolos de la siguiente manera: TIPO: A, B, C, tomando en cuenta las siguientes características: Tipo A: ovocito con células de cumulus con capas múltiples mayor a 4, compactas y con citoplasma homogéneo y transparente; Tipo B: capas múltiples de cumulus de 1 a 3 con citoplasma homogéneo y zonas periféricas oscuras; Tipo C: cumulus desnudado con citoplasma irregular con zonas oscuras.

- Una vez encontrados los ovocitos de tipo A (inmaduros) se procede a lavar en diversas gotas de holding colocadas en una caja petri diferente hasta que estén completamente limpios.
- En otra caja petri se coloca 3 o 4 gotas grandes de etilenglicol para proceder con el llenado de la pajilla de 0.25 en el extremo del algodón. En el proceso de llenado se absorbe un segmento de etilenglicol, se deja un espacio de aire, se absorbe los ovocitos, se deja un espacio de aire y otro segmento de etilenglicol para posteriormente sellar la pajilla con un tapón de embriones, pvc o bolitas.
- Luego se prende la criopreservadora, se llena de nitrógeno líquido y se ubica en la curva 3 de congelación lenta la misma que debe marcar -6 que es la temperatura óptima para colocar las pajillas previamente llenas y se espera 5 minutos y empieza la curva, la misma que se demora de 1 a 2 horas.
- Luego se realizará el empaquetado que consiste en introducir ovocitos en la pajilla con la misma técnica para embriones, es decir, suspendidos en un medio de congelación separado por 2 burbujas de aire en ambos extremos de la pajilla.
- Después de este transcurso de tiempo se puede sacar las pajillas desde -23 a -33°C para luego ser colocada en un termo de nitrógeno líquido.

2.4.1. POST DESCONGELACIÓN

Este proceso se realizó ocho días después de haber criopreservado en el cual se verificó la calidad y la viabilidad de los ovocitos.

El protocolo a seguir para llevar a cabo la descongelación es la siguiente:

- Abrir el termo de nitrógeno líquido donde se encuentran las pajuelas.
- Sacar con cuidado la canastilla sin sobrepasar la boca del termo de nitrógeno líquido.

- Rápidamente con una pinza se extrae la pajuela.
- Descongelar en agua a 37°C durante 45 segundos.
- Corta el extremo de la pajuela donde se encuentra el tapón.
- Sacudir con movimientos leves.
- Colocar el material en una caja Petri.
- Observar al estereomicroscopio para verificar la calidad y la viabilidad de los ovocitos descongelados.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente capítulo se detalla los resultados obtenidos en el proceso de experimentación, los análisis estadísticos y las representaciones gráficas de las variables: número de ovocitos, calidad de ovocitos, estado de madurez, crioconservación y post descongelación.

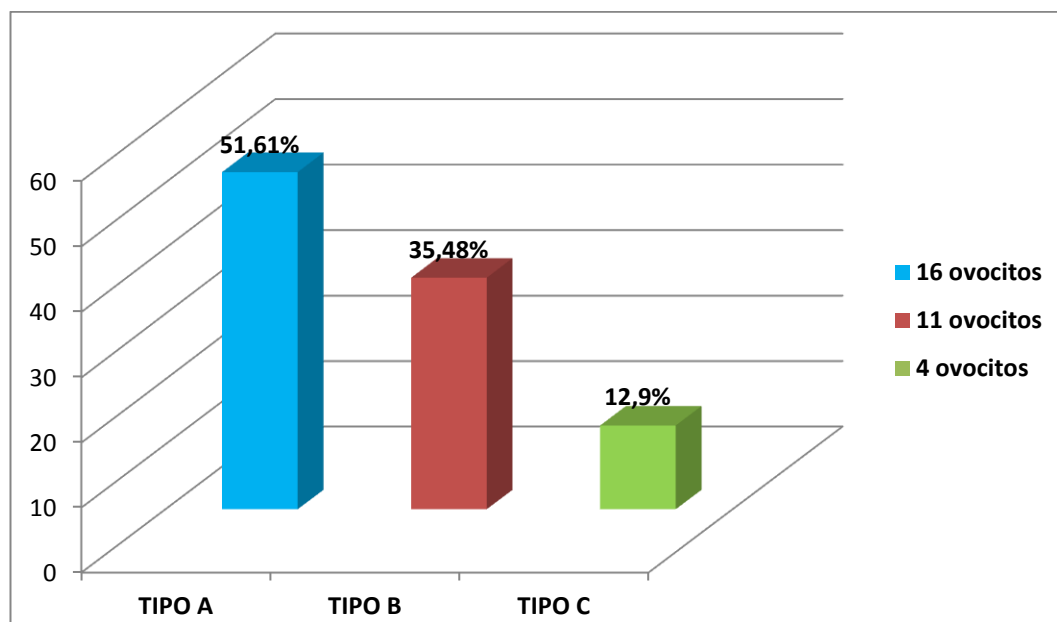
3.1. Número de ovocitos recolectados

CUADRO 4. OVOCITOS RECOLECTADOS Y CATEGORIZADOS EN TRES TIPOS

Nº PRÁCTICA	Nº OVARIOS	Nº OVOCITOS	TIPO A	TIPO B	TIPO C
1	4	6	4	1	1
2	4	5	2	1	2
3	4	7	4	2	1
4	4	8	3	5	0
5	4	5	3	2	0
TOTAL DE OVOCITOS		31	16	11	4
PORCENTAJE (%)		100	51.61	35.48	12.90

Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

GRÁFICO 1. CALIDAD DE OVOCITOS



Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

En relación a los 20 ovarios utilizados se pudo obtener 31 ovocitos, los cuales son distribuidos de la siguiente manera:

Tipo A: con 16 ovocitos que corresponden al 51,61%.

Tipo B: con 11 ovocito que corresponde al 35,48%.

Tipo C: con 4 ovocito que corresponde al 12,9%.

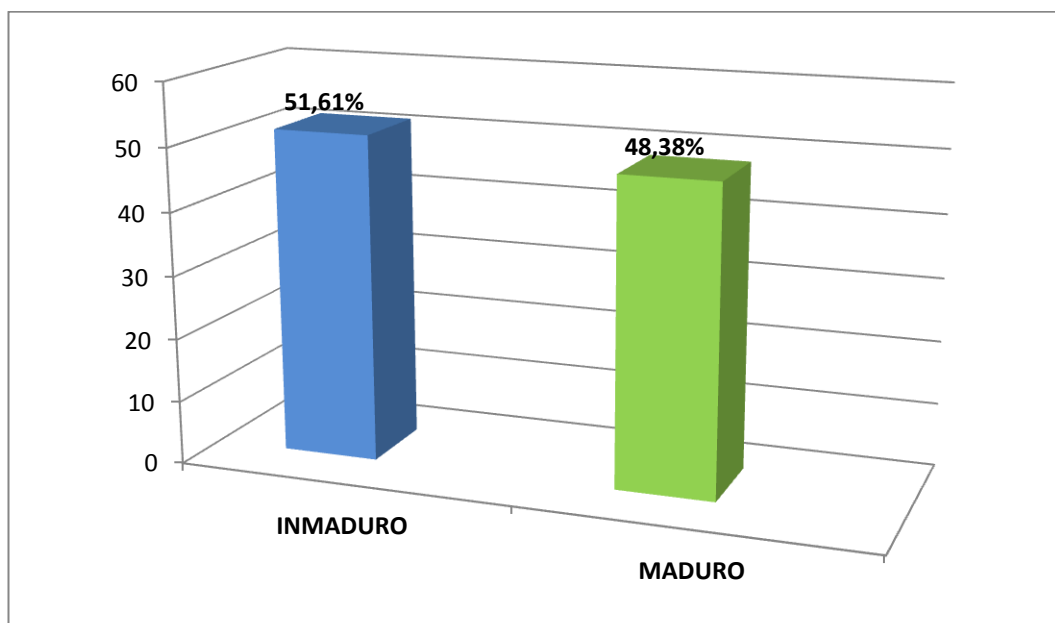
3.2. Estado de madurez

CUADRO 5. ESTADOS DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS

ESTADO DE MADUREZ	OVOCITOS	PORCENTAJE (100%)
Inmaduros	16	51,61
Maduros	15	48,38

Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

GRÁFICO 2. ESTADO DE MADUREZ DE LOS OVOCITOS



Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

Según el estado de madurez se determina que: 16 ovocitos tipo A son inmaduros que corresponde a un 51,61% y mientras que los 11 ovocitos tipo B y 4 ovocitos tipo C son maduros los cuales representan el 48,38%; en donde los tipo A son crioconservados para luego de 8 días ser descongelados.

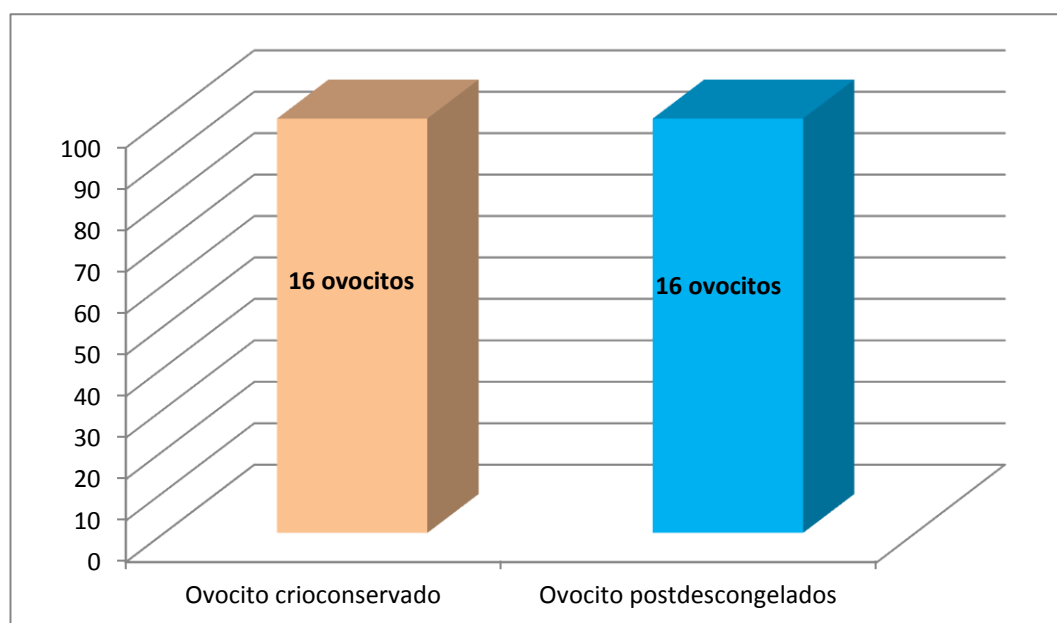
Esta cantidad de ovocitos maduros se debe a la inoculación de la hormona y que los ovocitos son muy sensibles a la manipulación.

CUADRO 6. CALIDAD DE OVOCITOS CRIOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADOS

	Ovocitos criopreservados	Ovocitos postdescongelados
Nº ovocitos	16	16
Total (%)	100	100

Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

GRÁFICO 3. CALIDAD DE OVOCITOS CRIOCONSERVADOS Y POST DESCONGELADOS



Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

La calidad de los 16 ovocitos tipo A criopreservados y posteriormente descongelados se mantuvieron viables y no cambiaron es decir se mantiene su calidad por lo que son aptos para la maduración y posterior fecundación in vitro.

CONCLUSIONES

- En esta investigación se logró determinar un protocolo de crioconservación de ovocitos en conejos, con el propósito de obtener y guardar material biológico.
- Se identificó un total de 31 ovocitos de 20 ovarios, categorizando según su calidad en: tipo A (excelente) 16 ovocitos con 51,61%; tipo B (bueno) 11 ovocitos con el 35,48% y tipo C (malo) 4 ovocitos con el 12,9%.
- Se crioconservó los 16 ovocitos tipo A, para su posterior descongelación; los mismos que mantuvieron la calidad, determinándoles viables.

RECOMENDACIONES

- Entre el tiempo de faenado y la llegada al laboratorio no debe pasar de las 2 horas ya que la calidad del material genético va disminuyendo progresivamente.
- La inoculación de hormonas 2 horas antes de faenar a los animales ayudará para obtener un porcentaje más elevado de ovocitos tipo A.
- Realizar próximas investigaciones evaluando técnicas de extracción de ovocitos, ya que son factores que pueden variar dependiendo del manejo en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBARRACÍN, M. 2005. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis de doctorado en Medicina y Cirugía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra. Pág.127. ISBN: 9582436371
2. ALBARRAN, Gonzales e. y Calderón r. Inseminación artificial y Andrología Veterinaria. Tomo I, La Habana. Editorial "Felix Varela". 2007. Pág. 80-86. ISBN: 9682446481.
3. ALVARIÑO, J. M. R. & UBILLA, E. 2003. Fisiología de la reproducción en la hembra. Ediciones mundiprensa, España. Págs. 50-57. ISBN: 9682446481
4. ARTHUR, g.h.; noakes; d.e; pearson; 2003. Reproducción y obstetricia en veterinaria. Editorial Interamericana. McGraw-hill. Pág. 35-41.
5. AZADA, D. (2000). Criopreservación de ovocitos y fertilización in vitro en Bovinos (1ª Ed.). Pág 148.ISBN: 698352124530
6. BARBADO, José Luis. Cría de conejos. 1ª ed. Buenos Aires: Albaratos, 2006, ISBN: 9502410440
7. BRACKET, g.b., siedel, s.m 2005. Avances en zootecnia. Nuevas técnicas de reproducción en conejos. Ed. Acribia, Zaragoza. ISBN: 9714574116
8. CABODEVILA J., TERUEL M., 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: Biotecnología de la reproducción. (ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina, Págs. 149-174. ISBN: 97856626891340

9. CABRERA P., FERNÁNDEZ A. 2006. Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria Central de Venezuela 2009. Venezuela. Págs. 85-90.
10. COLE, H.H y CUP, P.T. 2006. Reproducción de los animales domésticos. 3ª Edición. Editorial. Acribia. Zaragoza, España.
11. CÓRDOVA, A.; PELÁEZ, J; DOMÍNGUEZ, J; PEÑA, F.; ALEGRE, B. 2001. Posibilidades Futuras del Uso de Semen Congelado. Visión Técnica. Vol 3. Nº 1: 12-14. ISBN: 9874337686
12. CERVERA, C. & PASCUAL, J. J. 2006. Manejo de la alimentación de las conejas reproductoras. XXXI Symposium de Cunicultura de la Asociación Española de Cunicultura, Lorca, España., Págs. 225-241.
13. COOPER, G. W. & BEDFORD, J. M. 2001. Cambio de densidad de carga en la superficie vitelino tras la fertilización del huevo del conejo. J. Reprod. Fertil., 25, 431-436. ISBN: 8024582413
14. FERNÁNDEZ, Alberto Martín. Instrumentos de laboratorio. E.U.I.T, 1999. ISBN:8486892341
15. FRANCO, F, GADELLA M., 1998. Manual de crianza de conejos. Publicación Técnica FMV Nº 13. Febrero.
16. GARCÍA-GARCÍA, R. M., ARIAS-ÁLVAREZ, M., GARCÍA-PALENCIA, P., REVUELTA, L., SÁNCHEZ-MALDONADO, B., REBOLLAR, P. G. & LORENZO, P. L. 2007. Localización del receptor de prolactina en el ovario de conejas en diferentes estado fisiológicos. Actas de II XXXII Symposium de ASESCU. Jornadas Ibéricas sobre Cunicultura. Vila Real (Portugal). Boletín de Cunicultura., Págs. 151, 41-44.

17. HAFEZ, E. S. E. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. VI Cong. Reprod. Insem. Artif., Paris., Pág. 92-542-545-547. ISBN: 9701037197
18. HERNANDEZ, A, 2006. Fisiología de los animales. Editorial Médica Panamericana Madrid-España. 2ª edición. Págs. 97-100. ISBN: 8479039906
19. HASLER JONH F., 2002. The freezing, Thawing, and Transfer of Cattle Embryos. Factors Affecting Calf Crop. Biotechnology of Reproduction. Ed. CRC. Estados Unidos. Págs. 119-129.
20. JAINUDEEN M. R., DELAVEAU., WAHID H., HAFEZ E.S. E. 2002. Cap. 29. Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (ed.) Mc Graw-Hill Interamericana, México, Págs. 434-435. ISBN: 987455227
21. LAING J.A.; W.J. Brinley Morgan; W.C. Wagner; Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria; Cuarta edición; McGraw –Hill Interamericana de España; Madrid; Año 2006; ISBN 8476157495; páginas 1, 3, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 78; 90; 91; 92. ISBN: 997475958
22. LIM, P 2001. Fertilización in vitro en bovinos y biotecnología de la Reproducción Animal. Pág. 65-78. ISBN 50361849845
23. M. KAHN Cynthia, B.A., M.A. Manual Merck de Veterinaria, Barcelona España, 6ª edición 2007, editorial Océano/cemtrum. Págs; 1743-1762. ISBN: 97884784107798.
24. NUSSHAG, Anatomía y Fisiología de los animales domésticos, 7ª edición, Zaragoza-España 2006. Págs. 278-279-280-283-285-286-297-298-310-311-328-342-343-345, ISBN: 8420000906
25. PALMA, G. 2003. Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina. Pág. 11-13.

26. RAMÓN, J., RABEL, O. & PILES, M. 2004. Resultados de gestión en España GTE 2002. XXIX Simposio de cunicultura. ASESCU. Lugo (España). Pág. 29-32.
27. REBOLLAR, P. G. 2002. Inseminación artificial. Control de la reproducción en cunicultura., Madrid. Págs. 26, 33.
28. REBOLLAR, P. G. 2000. El aparato reproductor de la coneja y su ciclo hormonal. Sincronización y bioestimulación., Jornadas Profesionales de Cunicultura de la Real Escuela de Sitges (España). Págs. 15-18.
29. REBOLLAR, P. G., LORENZO, P. L., CARNEIRO, G. F. & LIU, I. K. M. 2001. Estudios preliminares sobre la migración de gránulos corticales en oocitos de conejas sometidas a distintos métodos de sincronización de celo. ITEA, 2. ISBN: 786331550784
30. ROA N. A., LINARES T., TAMASAUKAS R. 2003. Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol. VIII, Nº 1, Págs. 40-52
31. ROCA TG., HILL & WHITE., Vicente y Viudes de CASTRO., 2009. Inseminación Artificial en conejos Revista Freagas No. 35 Enero – Diciembre 2009, Pág. 28-35. ISBN: 910976233
32. RUIZ J, CORREA J. 2007. Desarrollo partenogenético in vitro con ovocitos vitrificados bovinos. Biotecnología de la reproducción. (ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina, Págs. 149-174. ISBN: 788531540562
33. SHIVELY. M.J. Anatomía Veterinaria Básica, Comparativa y clínica Manual Moderno. Sexta Edición USA, 2008, Págs. 163-180, ISBN:9684265697
34. WORLD Health Organization, 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ªedicion. ISBN 9243546503

ANEXOS

ANEXO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS

Nº práctica	Nº conejo	Nº ovarios	Ovocitos recuperados	Tipo A	Tipo B	Tipo C
1	1	1	0	0	0	0
		2	2	1	1	0
	2	3	3	2	0	1
		4	1	1	0	0
2	3	5	2	1	0	1
		6	1	0	0	1
	4	7	1	0	1	0
		8	1	1	0	0
3	5	9	2	1	0	1
		10	1	0	1	0
	6	11	2	2	0	0
		12	2	1	1	0
4	7	13	2	1	1	0
		14	3	1	2	0
	8	15	1	0	1	0
		16	2	1	1	0
5	9	17	1	1	0	0
		18	1	0	1	0
	10	19	2	1	1	0
		20	1	1	0	0
TOTAL			31	16	11	4

Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

ANEXO 2. NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS

Nº ovarios	Nº de práctica	Ovarios usados	Calidad de ovocitos		
			Tipo A	Tipo B	Tipo C
1	1	4	4	1	1
2					
3					
4					
5	2	4	2	1	2
6					
7					
8					
9	3	4	4	2	1
10					
11					
12					
13	4	4	3	5	0
14					
15					
16					
17	5	4	3	2	0
18					
19					
20					
TOTAL			16	11	4

Fuente: Directa

Elaborado por: CRUZ, Jorge

ANEXO 3. OVOCITOS PARA CRIOCONSERVAR

Nº práctica	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Aptos para crioconservar
1	4	1	1	4
2	2	1	2	2
3	4	2	1	4
4	3	5	0	3
5	3	2	0	3
TOTAL	16	11	4	16

Fuente: Directa

Elaborado por: CRUZ, Jorge

ANEXO 4. NÚMERO DE PAJILLAS CRIOCONSERVADAS

Nº práctica	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Pajillas obtenidas
1	4	1	1	1 con 4 ovocitos
2	2	1	2	1 con 2 ovocitos
3	4	2	1	1 con 4 ovocitos
4	3	5	0	1 con 3 ovocitos
5	3	2	0	1 con 3 ovocitos

Fuente: Directa
Elaborado por: CRUZ, Jorge

Foto 1. Extracción de ovarios al momento de faenar.



Foto 2. Ovarios extraídos colocados en cloruro de sodio al 0.9%.



Foto 3. Limpieza de estructuras adyacentes del ovario.



Foto 4. Método de slicing.



Foto 5. Lavado con holding.

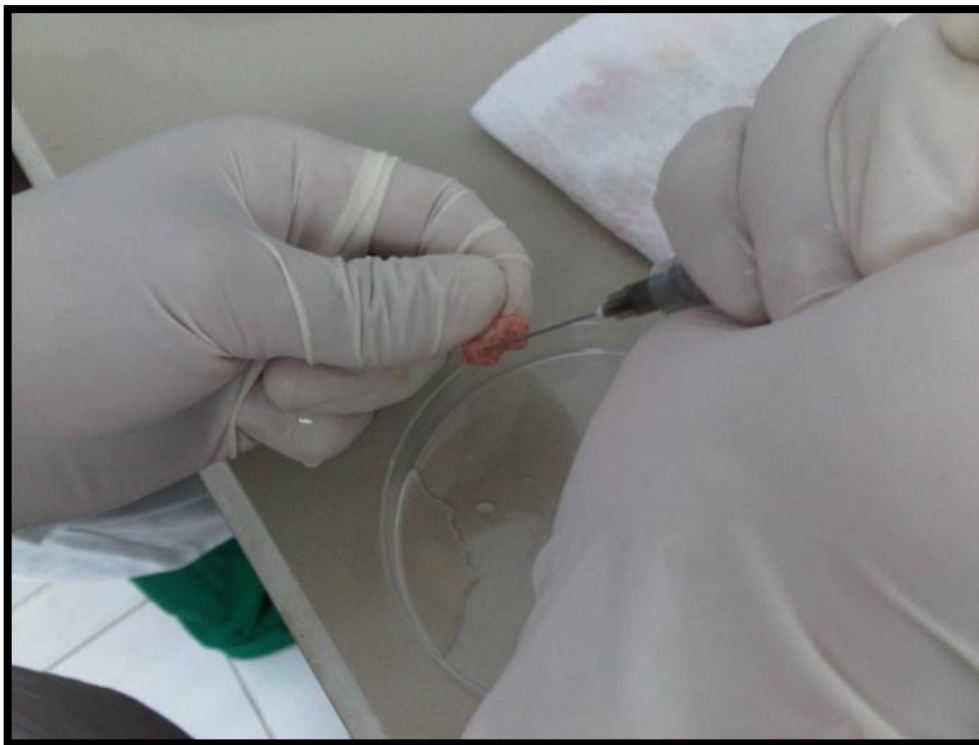


Foto 6. Colocación en la caja petri.

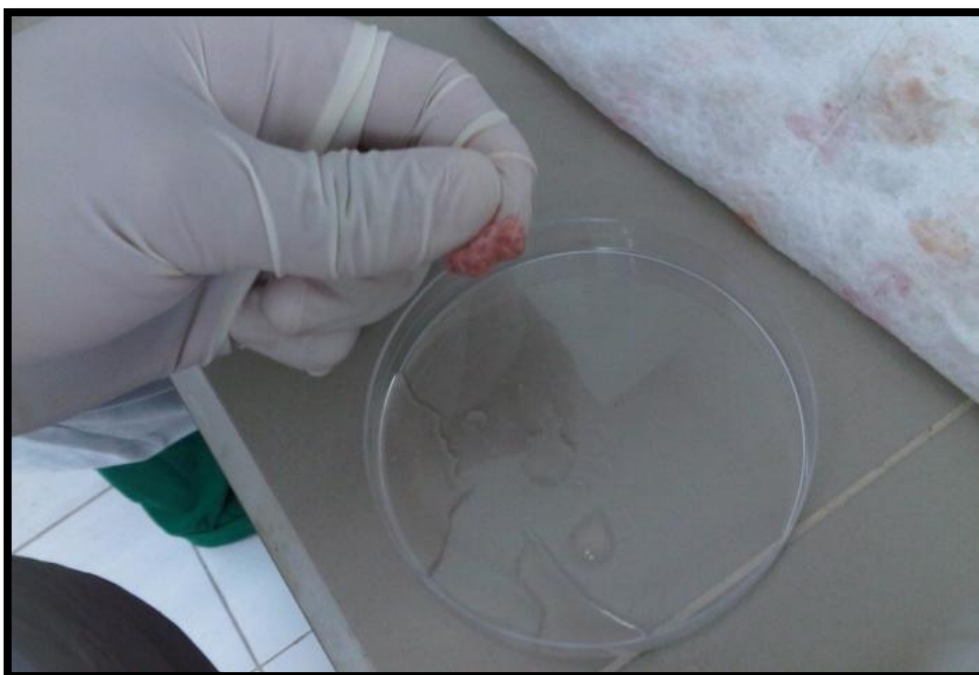


Foto 7. Extracción del líquido folicular.



Foto 8. Material extraído se pone en gotas de holding para quitar impurezas.

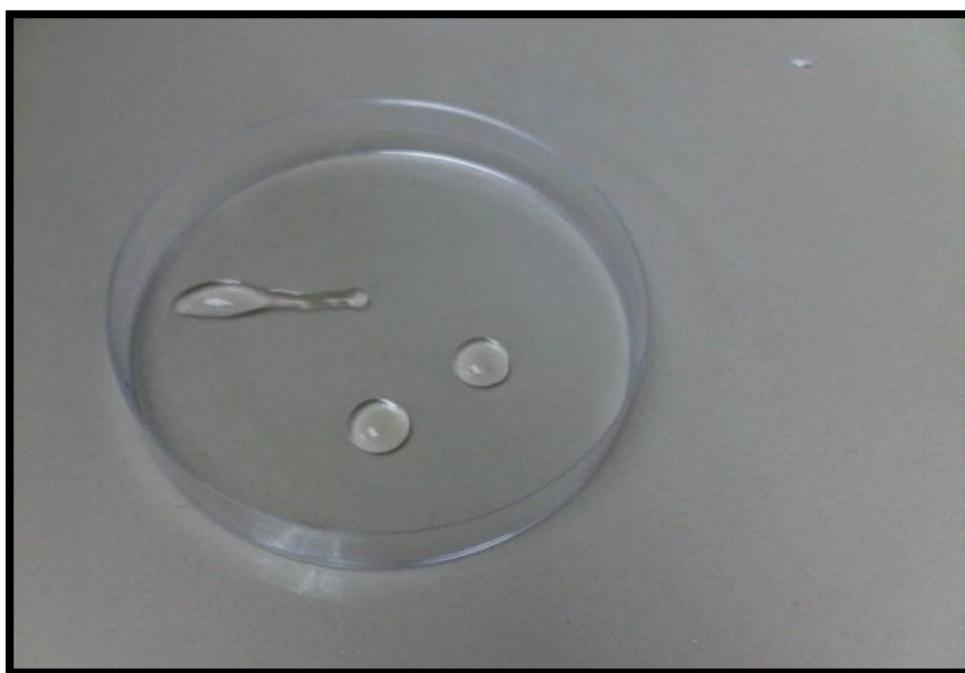


Foto 9. Se lleva al estereomicroscopio para identificar.



Foto 10. Clasificación por la calidad de ovocitos.

Tipo A



Tipo B



Tipo C

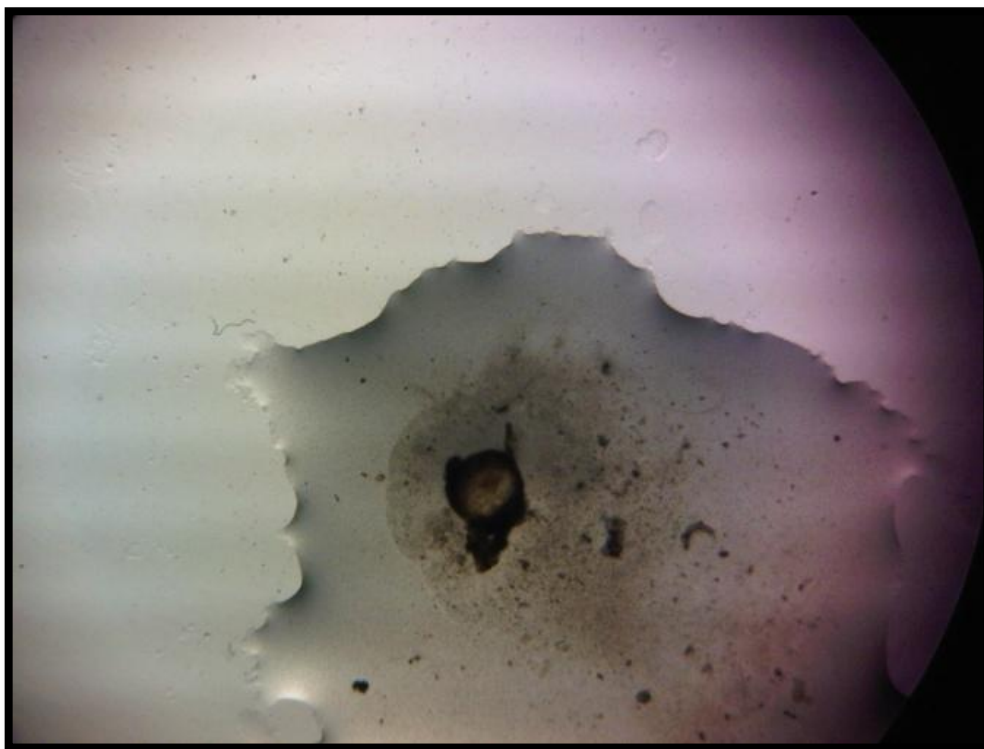


Foto 11. Colocación de la pajilla en la crioconservadora.



Foto 12. Se realiza Seeding.



Foto 13. Se evalúa post descongelación.

